دراسة التأثير العلاجي للمستخلص الكحولي لنبات السلبين (العكوب الجبلي) على مرض الكبد الدهني اللاكحولي المستحدث برابع كلوريد الكربون في الفئران ومقارنته بالأتورفاستاتين

د. محمد دريوس [*]

د. ريم سلامه [**]

يوسف أسعد [***]

(تاريخ الإيداع 19 / 5 / 2021. قبل للنشر في 10 / 8 / 2021)

□ ملخّص □

هدفت الدراسة إلى اختبار التأثير العلاجي للمستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين(العكوب الجبلي) في مرض الكبد الدهني اللاكحولي(non–alcoholic fatty liver) المستحدث في الفئران البيض وقياس بعض التغيرات الكيميائية الحيوية والنسيجية المرافقة لذلك، ومقارنتها بعقار الأتورفاستاتين .

أجريت الدراسة على 40 فأر قسمت إلى أربع مجموعات متساوية، حقنت الفئران على التوالي كالآتي: الأولى (الشاهدة) بالمحلول الفيزيولوجي NACL بتركيز (0.9%) ، والثانية بجرعة واحدة من رابع كلوريد الكربون ccl4 (1مل/كغ) لاستحداث التشحم، والثالثة بنفس الجرعة السابقة من ccl4 وبجرعات يومية من المستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين لمدة 10أسابيع (250 ملغ/ كغ من وزن الجسم)، والرابعة داخل الصفاق لمرة واحدة فقط بجرعة من ccl4 مع جرعات يومية من الأتورفاستاتين (250 ملغ/ كغ من وزن الجسم) لمدة 10أسابيع .

أظهرت نتائج الدراسة الحيوية الكيميائية ارتفاعا معنويا ($p<0.05$) في متوسطات قيم كل من (TG, ALT, AST) في فئران المجموعة الثانية بالمقارنة مع الشاهدة، كما أظهرت النتائج انخفاض معنوي ($p<0.05$) في متوسطات القيم السابقة في فئران المجموعتين الثالثة والرابعة بالمقارنة مع المجموعة الثانية، أما بالنسبة لمتوسطات قيم السكر فقد كان الارتفاع معنويا ($p<0.05$) في فئران المجموعة الرابعة مقارنة مع باقي المجموعات .

بينت نتائج الدراسة النسيجية لأكباد فئران المجموعة التجريبية الثانية ظهور تشحم واضح وصل في بعض الاحيان لدرجة التنخر، في حين أظهرت نتائج أكباد فئران المجموعتين الثالثة والرابعة تحسنا واضحا في الخلية الكبدية بالمقارنة مع المجموعة الثانية، حيث كان التشحم بحدوده الدنيا وهذا مايؤكد الدور العلاجي المهم لمستخلص أوراق السلبين بمكوناته الفعالة (إلى جانب الأتورفاستاتين) ضد مرض التشحم الكبدي اللاكحولي .

الكلمات المفتاحية: الكبد، رابع كلوريد الكربون، الكبد الدهني اللاكحولي، المستخلص الكحولي لأوراق السلبين .

[*] **أستاذ – قسم علم الحياة الحيوانية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية .**

[**] **مدرس – قسم كيمياء العقاقير – كلية الصيدلة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية .**

[***] **طالب دكتوراه – قسم علم الحياة الحيوانية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية .**

Study of the therapeutic effect of an alcoholic extract of (*Gundelia tournefortii*) on non-alcoholic fatty liver disease caused by carbon tetrachloride in albino rats and its comparison with atorvastatin

Dr. Mohamed Dreous*
Dr. Reem Salameh**
Youssef Asaad***

(Received 19 / 5 / 2021. Accepted 10 / 8 /2021)

□ ABSTRACT □

The study aimed to test the therapeutic effect of the alcoholic extract of *Gundelia tournefortii* leaf on non-alcoholic fatty liver disease induced in white mice and to identify some of the biochemical and histological changes associated with that.

The study was conducted on 40 mice in four equal groups. The mice of the experimental groups were respectively injected as follows: The first (control) with NACL physiological solution (0.9%), The second group were injected with a single dose of ccl4 (1 ml/kg) to induce lubrication, The third group was injected with the same previous dose of ccl4 and daily doses of the alcoholic extract of the leaves of the *Gundelia tournefortii* plant for 10 weeks (250 mg/kg of body weight), The forth group were injected intraperitoneally only once with a dose of ccl4 and with daily doses of Atorvastatin (250 mg/kg body weight) for 10 weeks.

The results of the biochemical study showed a significant increase ($p<0.05$) in the average values of (TG, ALT, and AST) in the second group compared with the control, and the results also showed a significant decrease ($p<0.05$) in the averages of the previous values in the third group and the fourth compared with the second group, as for the average sugar values the increase was significant ($p<0.05$) in the fourth group compared with the rest of the groups.

The results of the histological study of the livers of mice of the second experimental group showed the emergence of clear lubrication, which some cases reached the point of necrosis, while the results of the livers of mice of the third and fourth groups showed a clear improvement in the hepatic cell compared with the second group, where fat was minimal and this confirms the important therapeutic role of *Gundelia tournefortii* extract with its active ingredients (besides Atorvastatin) against the nonalcoholic lipidosis.

Keywords: liver, carbon tetrachloride, nonalcoholic fatty liver, alcoholic extract of *Gundelia tournefortii* leaves.

* **Professor - Department of Animal Biology - Facuaty of Science - Tishreen University - Lattakia - Syria.**
****Assistant Professor - Department of Drug Chemistry - Facuaty of Pharmacy - Tishreen University - Syria.**
*****PhD student - Department of Animal Biology - College of Sciences - Tishreen University - Syria**

مقدمة

اهتم الإنسان منذ القدم بالنباتات الطبيعية التي استخدمت كوسائل علاجية للكثير من الأمراض، وازداد الاهتمام بها كثيراً في السنوات الأخيرة نظراً لأهميتها بسبب غناها بالمركبات الكيميائية الفعالة وبما تحتويه من مضادات الاكسدة الضرورية للحد من الأضرار الناجمة عن حالات التسمم والتشحم الكبدي والاجهاد التأكسدي وتشكل الجذور الحرة [2] [1] .

ينتمي نبات السلبين (العكوب الجبلي) *Gundelia tournefortii* إلى الفصيلة النجمية Asteraceae، يتواجد في المناطق الجبلية غالباً، موطنه في سورية ولبنان وفلسطين والأردن وإيران وتركيا، وهو نبات شوكي بري معمر، جذوره سميكة، أوراقه ناعمة عادة [3]، وتستخدم كمكونات غذائية في الحساء والسلطات [4] .

تحتوي أوراق السلبين على مكونات مهمة مثل: الفلافونوئيدات، غليكوسيدات، صابونين، كربوهيدرات، قلوئيدات، حمض البالمتيك ، حمض اللوريك ، ألفا أيونين ، حمض الميريستيك ، 1 – هكساديكانول ، 2 – مثيل ، فينول ، بيتا تورميرون [5][6] .

تشير العديد من الدراسات إلى أهمية نبات السلبين نظرا لكونه يساهم في خفض مستويات الغلوكوز وشحوم الدم عند الفئران المعاملة بالدكساميثازون [7]، كما أنه يزيد من عدد وحركية الحيوانات المنوية ومستوى هرمون التستوستيرون عند الفئران بسبب مكوناته المضادة للأكسدة، كما يُستخدم لعلاج آلام الصدر والسكتات الدماغية، وهو مهدئ ومضاد التهاب ومكافح للطفيليات ومضاد للجراثيم ومضاد أكسدة [8]، مضاد للبكتريا والنشاط الالتهابي عند الجرذان[9].

يعرّف مرض الكبد الدهني غير الكحولي(non–alcoholic fatty liver) بأنه تراكم للدهون في الأنسجة الكبدية بنسب تتراوح بين (5– 10%) من وزن الكبد العام وذلك في حالة عدم التناول المفرط للإيثانول ويُشير هذا المرض إلى مجموعة عديدة من الاضطرابات التي لها صلة به بدءاً من التنكس الدهني البسيط والتهاب الكبد الدهني وصولاً للتليّف الكبدي المتقدم وتشمّع الكبد [10] ، حيث يحدث في البداية كمرحلة أولى مايسمّى التنكس الدهني الكبدي وفيه يتم ترسب الغليسيريدات الثلاثية كقطرات دهنية في أكثر من 5% من خلايا الكبد [11]، ويكون غالباً مايكون التنكس الدهني الكبدي محدوداً، لكن يمكن أن يتطور إلى مايسمى التهاب الكبد الدهني اللاكحولي والذي يتميز عن الحالة الأولى بتضخم الخلايا الكبدية وموت بعضها، بالإضافة إلى حدوث ارتشاحات التهابية وفي بعض الأحيان قد يحدث ترسب في ألياف الكولاجين حيث يُصاب (10–29%) من الاشخاص الذين يُعانون من الالتهاب الكبدي الدهني اللاكحولي بتليف الكبد وذلك في غضون 10سنوات [12]، ويُمكن أن يتطور تليّف الكبد في النهاية إلى سرطان الكبد [13] .

يلعب مرض الكبد الدهني وتراكم الغليسيريدات الثلاثية في الكبد دورا أساسيا في تفاقم الاضطرابات الاستقلابية المختلفة كالسمنة، ومرض السكري من النمطين الأول والثاني، وارتفاع ضغط الدم [14]، وقد أشارت الدراسات مؤخرا إلى مخاوف حول مرض التشحم الكبدي اللاكحولي، إذ قد يشكّل أحد عوامل الخطر المؤهبة للإصابة بسرطانات قد تتعدّى نطاق الكبد وتنتشر خارجه[15].

كما أظهرت الدراسات تأثير تغير أسلوب حياة الفرد وخاصة في عاداته الغذائية في ارتفاع معدّلات الإصابة بمرض الكبد الدهني اللاكحولي، وهذا ما تسبّب في اعتبار هذا المرض واحد من أكثر الأمراض المزمنة شيوعا [16]، لقد

تسبّب تكرار حدوث المرض إلى فتح آفاق أخرى للبحث من أجل إيجاد طرق جديدة للوقاية والعلاج ، حيث ركّزت الدراسات الحديثة على معرفة الجوانب الغذائية المسبّبة لهذا المرض، كما بيّنت التأثيرات المحتملة للمستخلصات النباتية العشبية، بالإضافة إلى المكملات الغذائية في منع التراكم الدهني داخل الكبد [17] .

يُعرف الأتورفاستاتين بـ (3–hydroxy–3–metylglutaryl coenzyme A) وهو يقوم بالتقليل من مستويات الدهون بشكل عام، وقد بيّنت الدراسات التي أُجريت على مجموعة من المرضى المصابين بمرض الكبد الدهني اللاكحولي بأنه يقلّل من ارتفاع الدهون ويخفّض من مستوى الكوليسترول، ويُعالج دهون الكبد المستحدثة عند فئران التجربة [18] .

أهمية البحث وأهدافه

تأتي أهمية هذه الدراسة في أنها تبحث في الكشف عن تأثير المستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين والتعرّف على دوره العلاجي في بعض الاضطرابات المتعلّقة بوظائف الكبد (كمرض التشحم الكبدي) كما أنها تُلقي الضوء على بعض التغيرات المرافقة له من خلال الكشف عن بعض المعايير الكيميائية المخبرية والتأكيد على إمكانية الاستفادة من موادها الفعّالة في مجال الصناعات الدوائية ومقارنتها مع العقار الدوائي الاتورفاستاتين المستخدم لعلاج ارتفاع الشحوم في الدم .

تهدف هذه الدراسة إلى الآتي:

- قياس تراكيز كل من (aspartate aminotransferase /AST ,triglycerdes /TG, alanine aminotransferase/ALT ،سكر الدم) في مصل دم الفئران البيض المستحدث فيها مرض التشحم الكبدي اللاكحولي .
- اختبار الفعل العلاجي للمستخلص الكحولي المحضر من أوراق نبات السلبين في الفئران المستحدث فيها مرض التشحم الكبدي اللاكحولي من خلال تحديد مستويات المعايير السابقة الذكر .
- اختبار تأثير الأتورفاستاتين في فئران التجربة المستحدث فيها مرض التشحم الكبدي اللاكحولي .
- دراسة التغيرات النسيجية لكبد الفئران المستحدث فيها التشحم الكبدي ومقارنتها مع التغيرات النسيجية لأكباد الفئران المعالجة بالمستخلص الكحولي لأوراق السلبين والأتورفاستاتين كل على حدة .

طرائق البحث ومواده

1. تحضير المستخلص الكحولي للسلبين :

تم تجفيف الأجزاء الهوائية من أوراق السلبين في الظل عند درجة حرارة الغرفة ثم طحنت إلى مسحوق ناعم في مطحنة ميكانيكية، وأُخذ المسحوق منها، حيث تم الاستخلاص بمزج (30 غ) من المسحوق مع (300 مل) من الايتانول 95%) لمدة 72 ساعة، ثم رشّح المنقوع باستخدام ورق الترشيح Whatman (رقم 1) ، وجُفّفت بواسطة المبخر الدوار [19].

2. تحضير المحاليل :

حُضّر محلول الحقن بحل 250 ملغ من الخلاصة (الراسب) في 10مل من مزيج مكون من (ماء مقطر، Dimethyl sulphoxide، TWEEN 20) بنسبة (8 :1 :1) ، حقنت المجموعات التجريبية بالمحلول في الصفاق بجرعة قدرها 1ميكرولتر لكل 1غ من وزن الفار .

3. تحضير تراكيز رابع كلور الكربون :

تمّ مزج حجم من رابع كلوريد الكربون مع حجم مساوٍ له من زيت الزيتون (Olea europaea) والذي يتبع للفصيلة الزيتونية (Oleaceae)، ثم حُقنت جرعة واحدة منه بمقدار(1مل/كغ) من وزن الفأر (تركيز **ccl4** فيه 50%) [20].

4. طريقة العمل :

– قُسّمت الفئران إلى أربع مجموعات، ضمت كل مجموعة (10) فئران ذكور، بعمر (3–4) أشهر، وتراوحت أوزانهم بين (20– 25غ) وتُنسب الفئران المستخدمة في التجربة إلى السلالة (Balb / c)، حيث تم إحضارها من قسم التقانة الحيوية في هيئة الطاقة الذرية، وضعت الحيوانات في مخابر قسم علم الحياة الحيوانية – جامعة تشرين، لمدة 2–3 أسابيع قبل بدء التجربة من أجل التكيف مع الظروف المناسبة مثل الضوء ودرجة الحرارة (18–20 درجة مئوية).

– حُقنت الفئران كالآتي : (الاولى أو **الشاهدة** بـ(0.05 مل) من المحلول الفيزيولوجي (0.9٪) فقط ولمدة 10 أسابيع، الثانية بجرعة واحدة من **ccl4** (1مل/كع) لاستحداث التشحم وتركت مدة 24 ساعة قبل العمل، وحقنت فئران المجموعة التجريبية الثالثة داخل الصفاق بجرعتين مختلفتين الأولى بجرعة واحدة من **ccl4** (1مل/كع) ، والثانية من المستخلص الكحولي لنبات السلبين (مقدار الجرعة 250 ملغ / كغم من وزن الجسم) لمدة (10) أسابيع، وحقنت أيضا فئران المجموعة التجريبية الرابعة جرعتين مختلفتين الأولى من **ccl4** (مقدار الجرعة 1 مل/كغ) لمرة واحدة فقط، والثانية من العقار الدوائي الاتورفاستاتين(مقدار الجرعة 250 ملغ / كغ من وزن الجسم) ولمدة 10 أسابيع .

5. جمع عينات الدم والكبد :

تم بعد الانتهاء من التجربة، تخدير الحيوانات عن طريق وضع قطنة مبللة بالايتر الايتيلي على الانف مباشرة لمدة خمس دقائق، ثم تم سحب الدم مباشرة بطعن القلب بإبرة حقن 5 مل، وضع الدم في أنابيب اختبار جافة وترك للتخثر تلقائيا بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة ثم وضع للتثفيل لمدة 15 دقيقة بسرعة 3000 دورة / دقيقة، جمع المصل بعدها في أنبوب ابندروف مرقم مسبقا، وحفظ المصل بدرجة 4 درجة مئوية لحين إجراء المعايرات الخاصة بمعايير التجربة وهي (السكر,ALT, AST, TG) حيث أجريت القياسات في جهاز سبيكتروفوتوميتير، شُرّحت الفئران بعدها وتم الحصول على الكبد من المجموعات التجريبية الأربعة، وحُفظت في عبوات خاصة مرقمة وحاوية على الفورمالين 10٪ من أجل إتمام الدراسة النسيجية .

6. الدراسة النسيجية :

حُضّرت أكباد حيوانات التجربة وعولجت بالكحول التجاري والكحول المطلق والزيلين، ثم تم تثبيتها بقوالب البارافين، تم عمل مقاطع نسيجية بسماكة (5) ميكرون باستخدام قطاع الأنسجة (Meditome A 550)، ثم عوملت بمحلول الكحول والزيلين تمهيدًا لتلوينها بالهيماتوكسيلين – يوزين وفقًا لطريقةMaity [21] . دُرست المقاطع النسيجية باستخدام مجهر ضوئي مزود بكاميرا رقمية ومتصل بجهاز كمبيوتر بهدف التعرف على المقاطع النسيجية في أكباد

الفئران السليمة والمعالجة تحت تأثير الجرعات المختلفة من المستخلص الكحولي لاوراق نبات السلبين ورابع كلوريد الكربون .

7. التحليل الإحصائي :

استخدم برنامج Statistical Package For Social Sciences (SPSS) للقيام بعملية التحليل الإحصائي واستخلاص النتائج، واتُبعت الأساليب الإحصائية الآتية: المتوسطات الحسابية والأخطاء المعيارية، تحليل التباين الأحادي one way anova للمقارنة بين المتوسطات، اختبار- تي Studients t-test، اختبار LSD5 عند مستوى 5% للمقارنة بين متوسطات المعايير المدروسة لمختلف المجموعات .

النتائج والمناقشة

1. نتائج الدراسة الحيوية الكيميائية :

1.1. دراسة تأثير كل من المستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين والأتورفاستاتين، مقارنة مع المجموعة الشاهدة والمجموعة المستحدث فيها التشحم فقط .

- **معيار TG:**

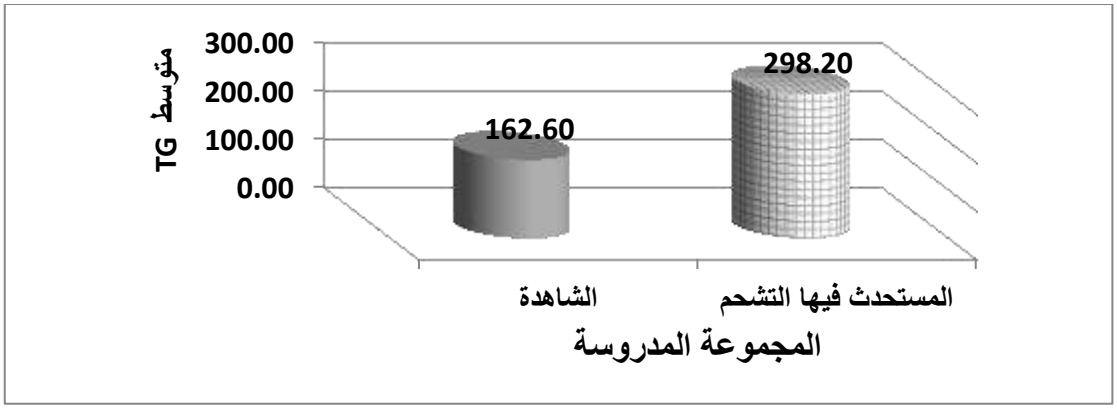
- المقارنة بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم:

تم لإجراء المقارنة استخدام اختبار تي للعينات المستقلة independent sample t.test الموضّحة نتائجه في الجدول(1):

الجدول(1): اختبار الفرق في متوسط TG ملغ/د.ل بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم

الشاهدة	المستحدث فيها التشحم	فرق المتوسطات	t.test	p-value	النتيجة
162.6 ± 7.99	298.2 ± 46.66	135.6	6.405	**0	دال إحصائياً

لقد لوحظ أنّ p-value<0.05 وعليه توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط TG بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم وأن قيمة t=6.405 وقيمة الفرق 135.6، وبما أن الفرق موجب بالتالي هناك ارتفاع معنوي في متوسط TG لدى استحداث التشحم وبنسبة 83.39% ويوضّح ذلك بالشكل(1).



الشكل (1) : متوسطات TG بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم

- **المقارنة بين المجموعة المستحدث فيها التشحم والسلبين والمعالجة بالاتورفاستاتين:**

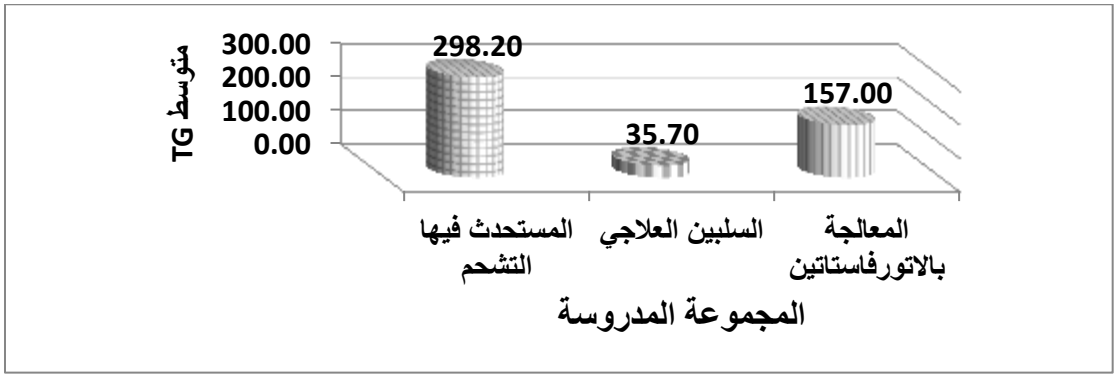
تم استخدام اختبار تحليل التباين one way anova لاختبار الفرق في متوسط TG بين المجموعات المدروسة الموضحة نتائجه في الجدول (2):

الجدول(2) اختبار الفرق في متوسط TG بين المجموعات المدروسة

ANOVA

مصدر التباين	مجموع المربعات	درجات الحرية	متوسط المربعات	F احصاء فيشر	p-value
بين المجموعات	235140.055	2	117570.027	221.415	.000
داخل المجموعات	10088.900	19	530.995		
الكلي	245228.955	21			

يُلاحظ من الجدول السابق أن $p-value<0.05$ وعليه توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط TG بين المجموعات المدروسة ويوضّح ذلك بالشكل(2).



الشكل (2) : متوسطات TG بين المجموعات المدروسة

بينت النتائج أن أعلى متوسط لـTG كان في المجموعة المستحدث فيها التشحم، حيث كانت أعلى من مجموعة السلبين العلاجي بنسبة 735.29%، ومن المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين بنسبة 89.94%، كما أن متوسط المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين كان أعلى من متوسط مجموعة السلبين العلاجي بنسبة 339.78%، ولاستنتاج أماكن تواجد تلك الفروق تم استخدام اختبار LSD5% الموضحة نتائجه في الجدول(3).

الجدول (3): متوسطات TG في مجموعات العمل .

المجموعة	$mean \pm sd$	LSD5%
المستحدث فيها التشحم	C298.2 ± 46.66	26.42
سلبين علاجي	A35.7 ± 10.72	
المعالجة بالأتورفاستاتين	B157 ± 7.59	

حيث كل متوسطين لهما حرف مشترك بالتالي لا يوجد بينهما فرق معنوي(أو كل متوسطين الفرق بينهما أقل من قيمة LSD5% لا يوجد بينهما فرق معنوي) وعليه يوجد فرق معنوي ذو دلالة إحصائية بين جميع المجموعات.

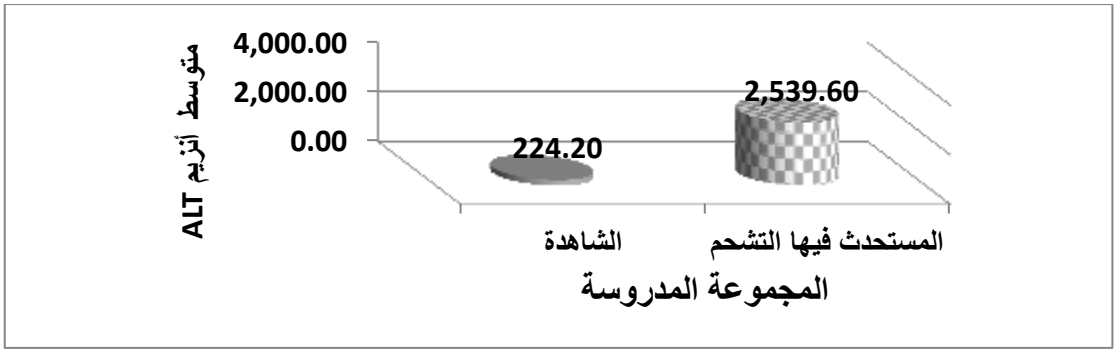
- **مقارنة ALT بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم:**

تم لإجراء المقارنة استخدام اختبار تي للعينات المستقلة independent sample t.test الموضحة نتائجه في الجدول(4):

الجدول(4) اختبار الفرق في متوسط أنزيم ALT (وحدة دولية/ليتر)بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم

الشاهدة	المستحدث فيها التشحم	فرق المتوسطات	t.test	p–value	النتيجة
224.2 ± 15.66	2539.6 ± 371.65	2315.4	13.919	**0	دال إحصائياً

يُلاحظ أن p–value<0.05 وعليه توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط أنزيم ALT بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم، وأن قيمة t=13.919 وقيمة الفرق 2315.4 وبما أن الفرق موجب بالتالي هناك ارتفاع معنوي في متوسط أنزيم ALT لدى استحداث التشحم وبنسبة 1032.74% أي ما يزيد عن عشرة أضعاف ويُوضح ذلك بالشكل(3).



الشكل (3) : متوسطات ALT بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم

- مقارنة متوسطات تراكيز ALT بين المجموعة المستحدث فيها التشحم والمجموعتان المعاملتان بالسلبين والاتورفاستاتين:

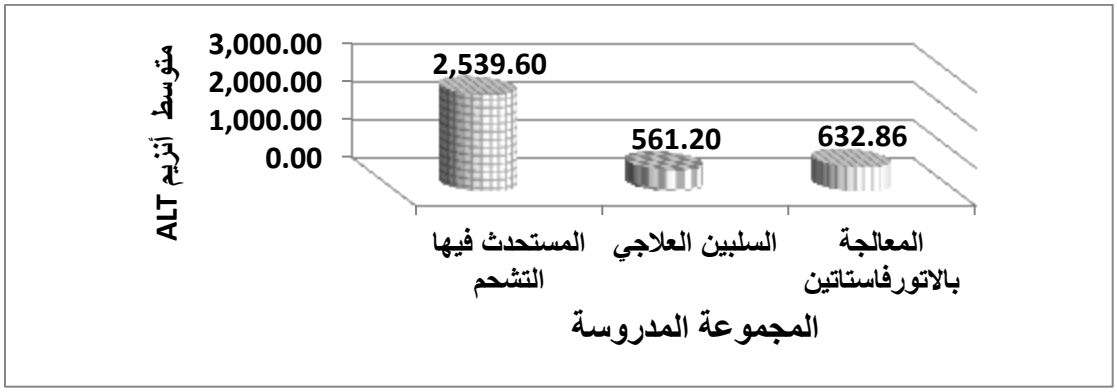
تم استخدام اختبار تحليل التباين one way anova لاختبار الفرق في متوسط ALT بين المجموعات المدروسة الموضحة نتائجه في الجدول (5):

الجدول(5) اختبار الفرق في متوسط ALT (وحدة دولية/ليتر)بين المجموعات المدروسة

ANOVA

مصدر التباين	مجموع المربعات	درجات الحرية	متوسط المربعات	F (احصاء فيشر)	p–value
بين المجموعات	1.470E7	2	7347980.717	196.982	.000
داخل المجموعات	708753.657	19	37302.824		
الكلي	1.540E7	21			

يُلاحظ من الجدول السابق أنّ p–value<0.05، وعليه توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط ALT بين المجموعات المدروسة ويُوضح ذلك بالشكل(4).



الشكل (4) : متوسطات قيمALT بين المجموعات المدروسة

حيث نلاحظ أن أعلى متوسط لأنزيم ALT كان في المجموعة المستحدث فيها التشحم حيث كانت أعلى من مجموعة السلبين العلاجي بنسبة 352.53% ، ومن المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين بنسبة 301.29%، كما أن متوسط المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين كان أعلى من متوسط مجموعة السلبين العلاجي بنسبة 12.77%، ولاستنتاج أماكن تواجد تلك الفروق تم استخدام اختبار LSD5% الموضحة نتائجه في الجدول(6):

الجدول (6): متوسطات ALT (وحدة دولية/ليتر) في مجموعات العمل .

المجموعة	$mean \pm sd$	LSD5%
المستحدث فيها التشحم	B2539.6 ± 371.65	221.41
المعاملة بمستخلص أوراق السلبين	A561.2 ± 124.15	
المعالجة بالأتورفاستاتين	A632.86 ± 54.07	

يدل الحرف المشترك لكل متوسطين على أنّه لا يوجد بينهما فرق معنوي(أو كل متوسطين الفرق بينهما أقل من قيمة LSD5% لا يوجد بينهما فرق معنوي) وعليه لا يوجد فرق معنوي ذو دلالة إحصائية بين مجموعة السلبين العلاجي والمعالجة بالأتورفاستاتين اللذين اختلفا معنوياً عن المجموعة المستحدث فيها التشحم.

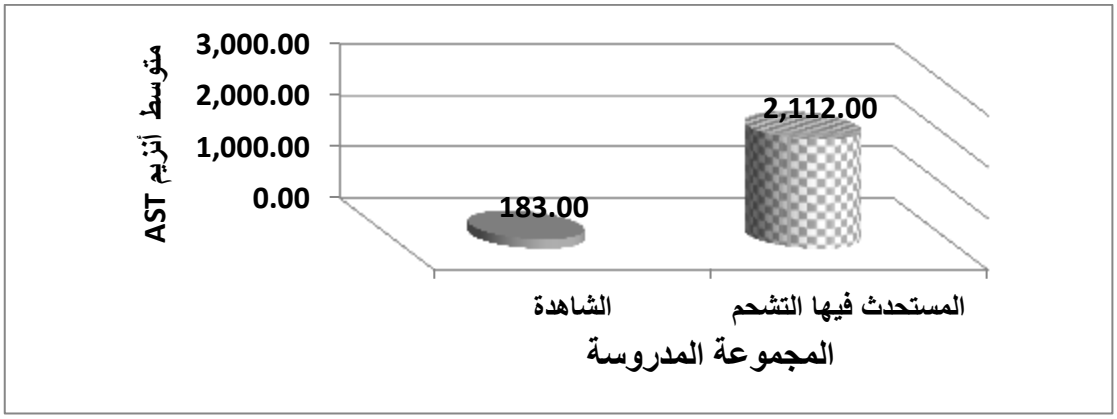
- **مقارنة AST بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم:**

تم لإجراء المقارنة استخدام اختبار تي للعينات المستقلة independent sample t.test الموضّحة نتائجه في الجدول(7):

الجدول(7) اختبار الفرق في متوسط أنزيم AST (وحدة دولية/ليتر) بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم

الشاهدة	المستحدث فيها التشحم	فرق المتوسطات	t.test	p-value	النتيجة
183 ± 9.82	2112 ± 296.51	1929	14.539	**0	دال إحصائياً

يُلاحظ أن p-value<0.05 وعليه توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط أنزيم AST بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم وأن قيمة t=14.539 وقيمة الفرق 1929 وبما أن الفرق موجب بالتالي هناك ارتفاع معنوي في متوسط أنزيم AST لدى استحداث التشحم وبنسبة 1054.09% أي ما يزيد عن عشرة أضعاف ويُوضح ذلك بالشكل(5).



الشكل (5) : متوسطات AST بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم

- مقارنة متوسطات تراكيز AST بين المجموعة المستحدث فيها التشحم والمجموعتان المعاملتان بالسلبين والاتورفاستاتين:

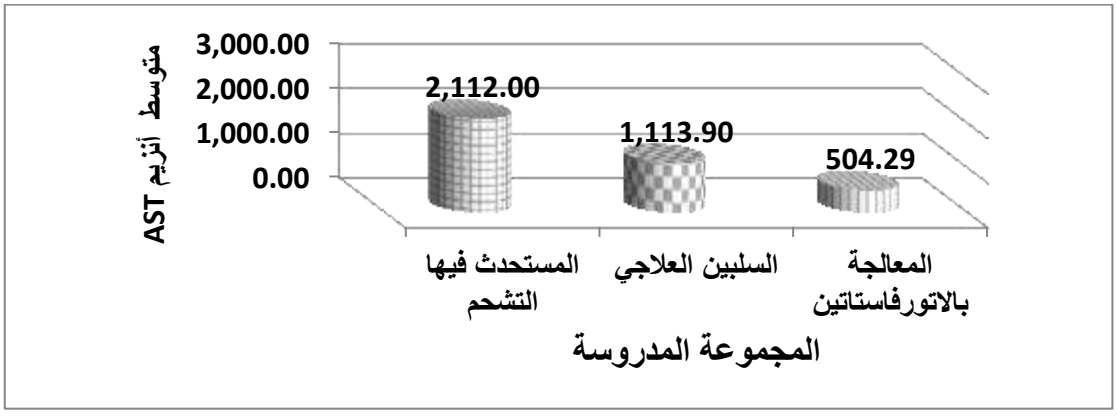
تم استخدام اختبار تحليل التباين one way anova لاختبار الفرق في متوسط AST بين المجموعات المدروسة الموضّحة نتائجه في الجدول (8):

الجدول(8) اختبار الفرق في متوسط AST (وحدة دولية/ليتر) بين المجموعات المدروسة

ANOVA

مصدر التباين	مجموع المربعات	درجات الحرية	متوسط المربعات	F احصاء فيشر	p–value
بين المجموعات	7558651.535	2	3779325.768	146.772	.000
داخل المجموعات	489244.329	19	25749.702		
الكلي	8047895.864	21			

يُلاحظ من الجدول السابق أنّ p–value<0.05 وعليه توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط AST بين المجموعات المدروسة ويُوضح ذلك بالشكل(6).



الشكل (6) : متوسطات قيمAST بين المجموعات المدروسة

لقد لُوحظ أن أعلى متوسط لأنزيم AST كان في المجموعة المستحدث فيها التشحم، حيث كانت أعلى من مجموعة السلبين العلاجي بنسبة 89.60% ، ومن المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين بنسبة 318.81%، كما أن متوسط

مجموعة السلبين العلاجي كان أعلى من متوسط المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين بنسبة 120.89%، ولاستنتاج أماكن تواجد تلك الفروق تم استخدام اختبار LSD5% الموضّحة نتائجه في الجدول(9):

الجدول (9): متوسطات AST(وحدة دولية/ليتر) في مجموعات العمل .

المجموعة	$mean \pm sd$	LSD5%
المستحدث فيها التشحم	$C2112 \pm 296.51$	183.96
المعاملة بمستخلص السلبين	$B1113.9 \pm 116.33$	
المعالجة بالأتورفاستاتين	$A504.29 \pm 51.27$	

يدل الحرف المشترك لكل متوسطين على أنّه لا يوجد بينهما فرق معنوي(أو كل متوسطين الفرق بينهما أقل من قيمة LSD5% لا يوجد بينهما فرق معنوي) وعليه يوجد فرق معنوي ذو دلالة إحصائية بين جميع أزواج المجموعات.

- **السكر:**

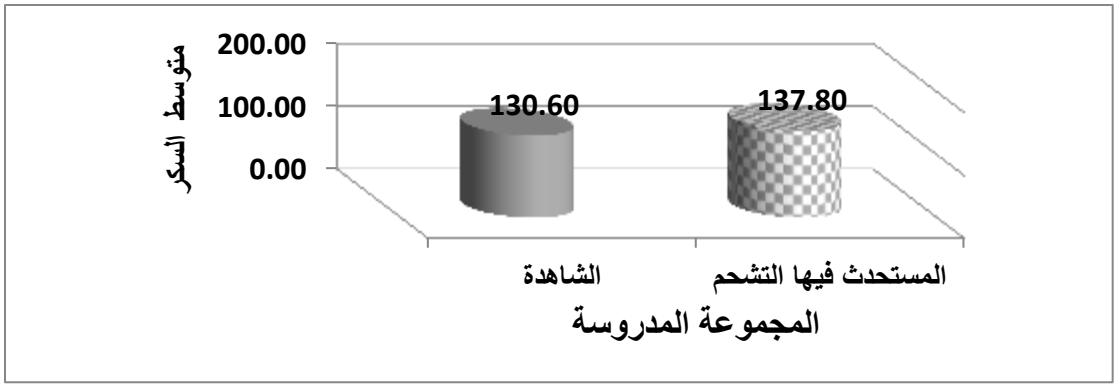
- المقارنة بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم:

تم لإجراء المقارنة استخدام اختبار تي للعينات المستقلة independent sample t.test الموضّحة نتائجه في الجدول(10):

الجدول(10) اختبار الفرق في متوسط السكر ملغ/د.ل بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم

الشاهدة	المستحدث فيها التشحم	فرق المتوسطات	t.test	p-value	النتيجة
130.6 ± 16.46	137.8 ± 8.93	7.2	0.860	n.s0.415	غير دال إحصائياً

يُلاحظ أنّ p-value>0.05 وعليه لا توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط تركيز السكر بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم وأن قيمة t=0.860 وقيمة الفرق 7.2 وبما أن الفرق موجب بالتالي هناك ارتفاع غير معنوي في متوسط السكر لدى استحداث التشحم وبنسبة 5.51% ويُوضّح ذلك بالشكل(7).



الشكل (7) : متوسطات السكر بين المجموعة الشاهدة والمستحدث فيها التشحم

- **المقارنة بين المجموعة المستحدث فيها التشحم والمجموعتان المعاملتان بالسلبين والاتورفاستاتين:**

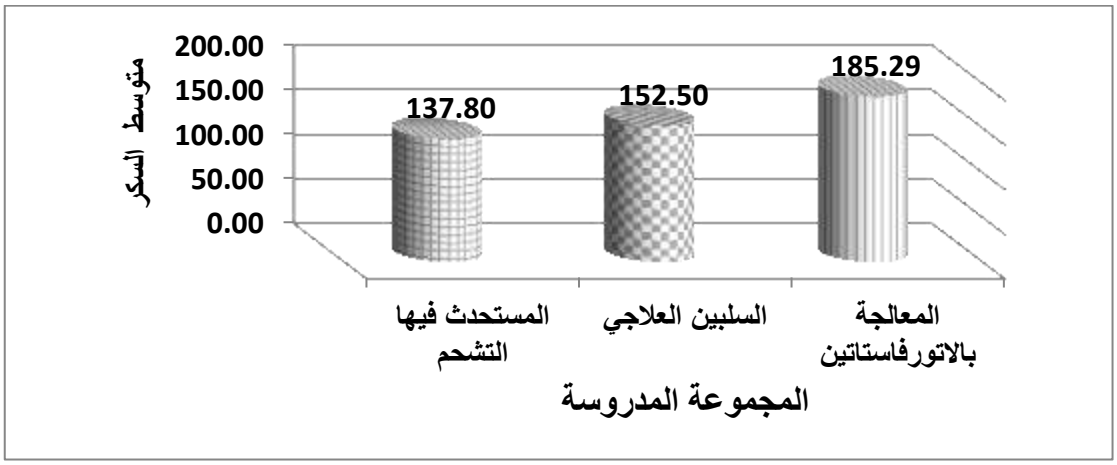
تم استخدام اختبار تحليل التباين one way anova لاختبار الفرق في متوسط السكر بين المجموعات المدروسة الموضّحة نتائجه في الجدول (11):

الجدول(11) اختبار الفرق في متوسط السكر ملغ/د.ل بين المجموعات المدروسة

ANOVA

مصدر التباين	مجموع المربعات	درجات الحرية	متوسط المربعات	F احصاء فيشر	p–value
بين المجموعات	7498.590	2	3749.295	14.637	.000
داخل المجموعات	4866.729	19	256.144		
الكلي	12365.318	21			

نلاحظ من الجدول السابق أن p–value>0.05 وعليه لا توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط السكر بين المجموعات المدروسة ويُوضح ذلك بالشكل(8).



الشكل (8) : متوسطات السكر بين المجموعات المدروسة

لقد لوحظ أنّ أعلى متوسط للسكر كان في المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين حيث كانت أعلى من مجموعة السلبين العلاجي بنسبة 21.50% ، ومن المجموعة المستحدث فيها التشحم بنسبة 34.46%، كما أن متوسط مجموعة السلبين العلاجي كان أعلى من متوسط المجموعة المستحدث فيها التشحم بنسبة 10.67%، ولاستنتاج أماكن تواجد تلك الفروق تم استخدام اختبار LSD5% الموضّحة نتائجه في الجدول (12):

الجدول (12) : متوسطات السكر بين المجموعات المدروسة

المجموعة	$mean \pm sd$	LSD5%
المستحدث فيها التشحم	A137.8 ± 8.93	18.35
المعاملة بمستخلص السلبين	A152.5 ± 21.89	
المعالجة بالأتورفاستاتين	B185.29 ± 6.26	

يدل الحرف المشترك لكل متوسطين على أنّه لا يوجد بينهما فرق معنوي(أو كل متوسطين الفرق بينهما أقل من قيمة LSD5% لا يوجد بينهما فرق معنوي) وعليه يوجد فرق معنوي ذو دلالة إحصائية بين المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين وباقي المجموعات.

2. نتائج الدراسة النسيجية :

2.1. تأثير الحقن برابع كلوريد الكربون على البنية النسيجية في كبد الفئران:

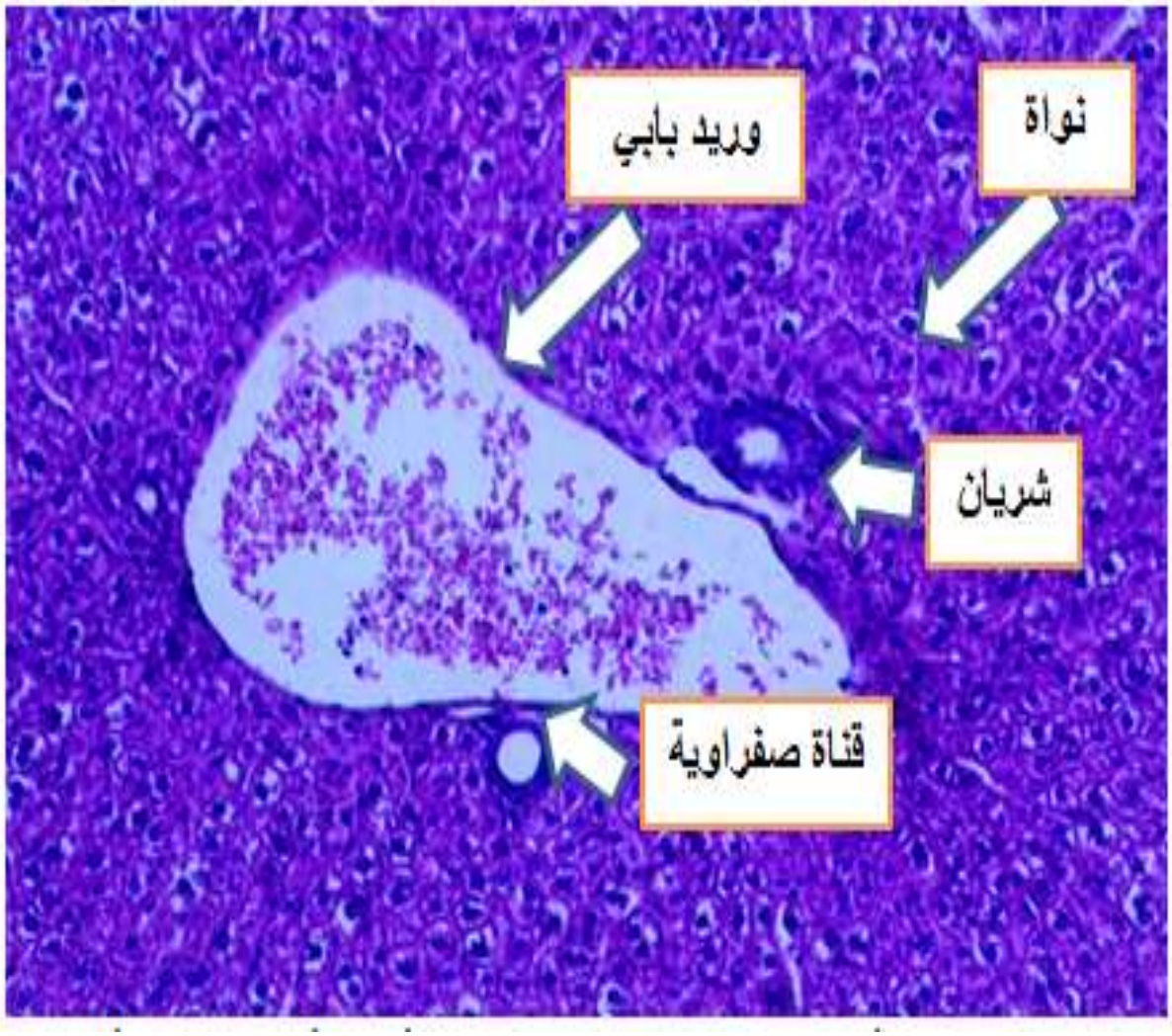
أظهرت نتائج الدراسة النسيجية لكبد فئران المجموعة التجريبية الثانية المعاملة برابع كلوريد الكربون حدوث تشحم شمل كامل الساحة المجهرية ووصل أحيانا هذا التشحم إلى درجة التنخر حيث لوحظ تشكل استحالات شحمية في الخلايا الكبدية مما أدى إلى تغّير تموضع نواة الخلية المتشحمة من المركز(الشكل9 يوضح توضع نواة الخلية الطبيعية في المركز) باتجاه المحيط من جراء المعاملة برابع كلوريد الكربون كما هو مبين في الشكل (10) .

2.2. تأثير رابع كلوريد الكربون والمستخلص الكحولي للسلبين في كبد الفئران :

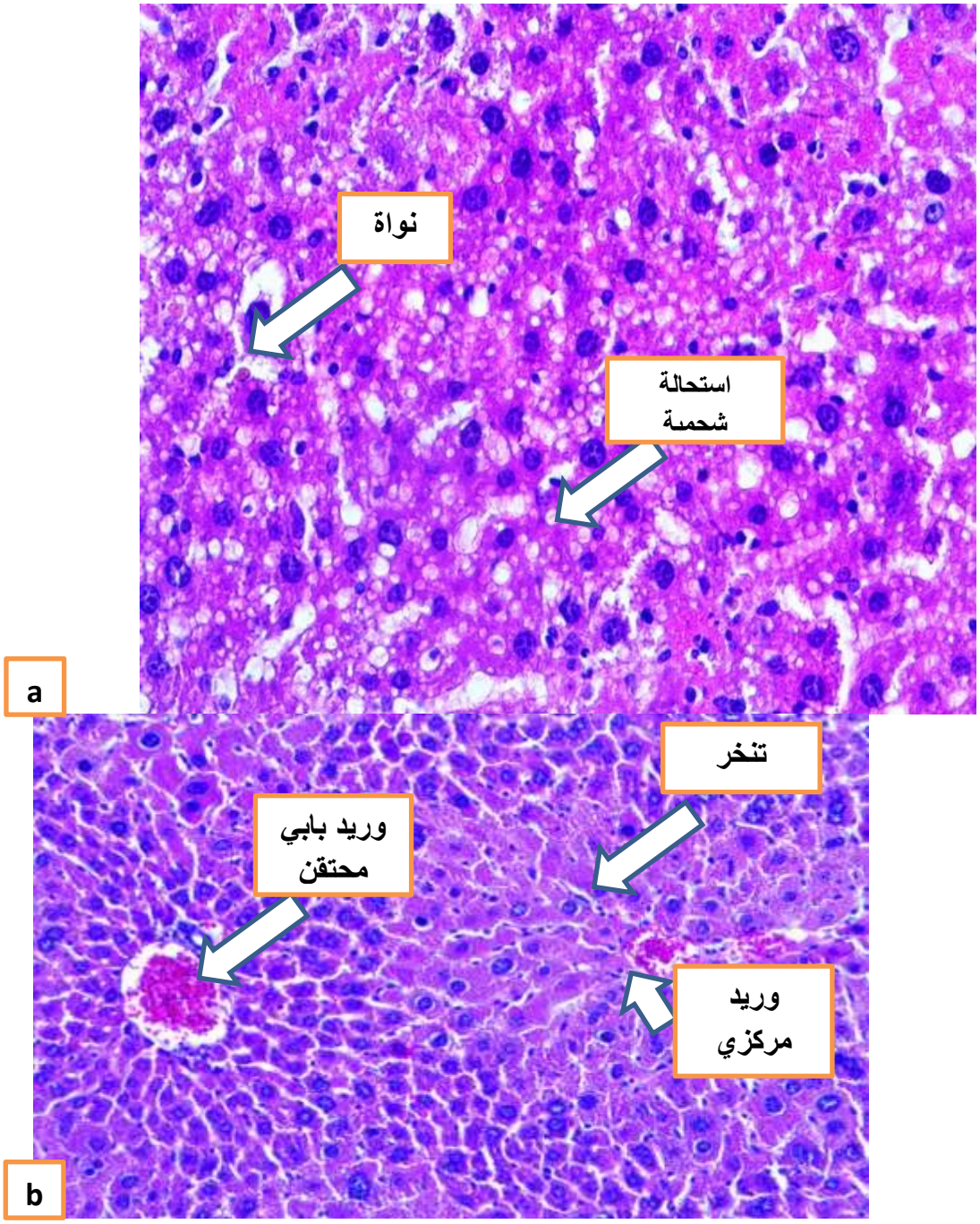
أظهرت نتائج الدراسة النسيجية لكبد فئران المجموعة التجريبية الثالثة المعاملة بجرعات منفردة من رابع كلوريد الكربون وبجرعات يومية من المستخلص الكحولي للسلبين (لمدة 10 أسابيع) تحسنا واضحا في الخلية الكبدية بالمقارنة مع المجموعة الثانية، حيث كان التشحم بحدوده الدنيا حيث نلاحظ وجود عدد قليل جدا من الاستحالات الشحمية والبؤر الإلتهابية كما هو مبين في الشكل (11).

2.3. تأثير رابع كلوريد الكربون وعقار الأتورفاستاتين في كبد الفئران :

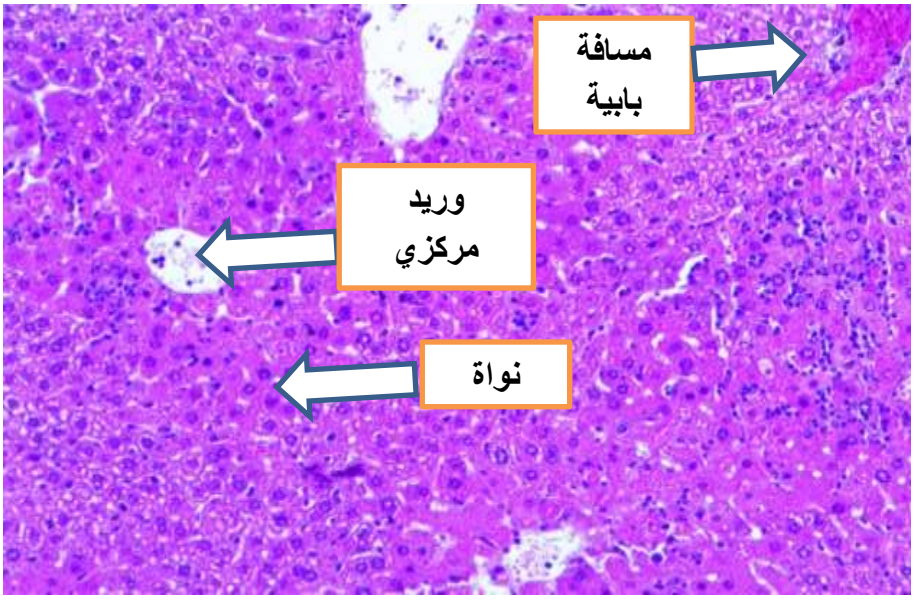
أظهرت نتائج الدراسة النسيجية لكبد فئران المجموعة التجريبية الرابعة المعاملة بجرعات منفردة من رابع كلوريد الكربون وجرعات يومية من عقار الأتورفاستاتين (لمدة 10 أسابيع) أيضا تحسنا واضحا في الخلية الكبدية، حيث لم يُلاحظ وجود فراغات شحمية أي أن التشحم بحدوده الدنيا مقارنة بالمجموعة الثانية، كما لوحظ تراجع في الأذية الشحمية والخلايا الكبدية متجمعة على شكل حبال كما هو مبين في الشكل(12) .



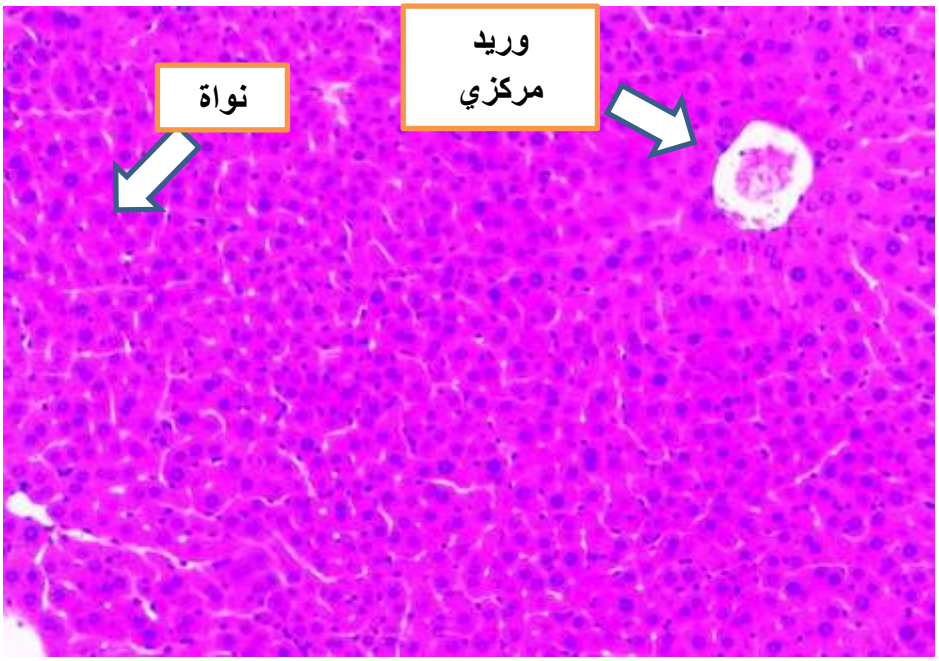
الشكل (9) البنية النسيجية لكبد المجموعة الشاهدة (x40)



الشكل(10): صورة مجهرية لمقاطع نسيجية في أكباد المجموعة الثانية التي جرعت برابع كلوريد الكربون. (a) ظهور الاستحالات الشحمية في المقطع النسيجي مما دفع النواة المركزية باتجاه المحيط (x100) ، (b) تضرر النسيج الكبدي لدرجة التنخر والسيتوبلاسما أيوزينية وحدود الخلايا غير واضحة بالاضافة لظهور التنخر حول الوريد المركزي (x100).



الشكل(11): مقطع نسيجي في كبد أحد أفراد المجموعة الثالثة التي جُرّعت بمستخلص السلبين وبرابع كلوريد الكربون: حيث نلاحظ تحسنا واضحا وتراجع علامات الأذى في الخلايا الكبدية مع عودة الخلايا لوضعها الطبيعي (x40) .



الشكل (12) : مقطع نسيجي في كبد أحد أفراد المجموعة الرابعة التي جرعت بالأتورفاستاتين وبرابع كلوريد الكربون: يُلاحظ تراجع علامات الأذى في الخلايا الكبدية وعودتها لوضعها الطبيعي (x40) .

المناقشة :

بينت نتائج الدراسة الحالية الجدولين (1، 3) أن أعلى متوسط لـ TG كان في المجموعة المستحدث فيها التشحم مقارنة مع الشاهدة ومجموعات السلبين والعقار الدوائي (الأتورفاستاتين)، كما كانت الفروق معنوية $P<0.05$ بين مجموعة السلبين ومجموعة الأتورفاستاتين مقارنة مع المجموعة المستحدث فيها التشحم، فالمعالجة برابع كلوريد الكربون تتسبّب بتجمع الدهون داخل سيتوبلاسما الخلية الكبدية، مما أثر بشكل واضح وجلي على وظائفها بشكل عام [22]، كما تسبّبت المعالجة بجرعة منفردة من رابع كلوريد الكربون الواردة في الجدولين (4، 7) إلى ارتفاع معنوي $P<0.05$ في تراكيز كل من ALT و AST في مصل دم حيوانات المجموعة الثانية بالمقارنة مع الشاهدة . تتوافق ذلك مع نتائج الدراسات الأخرى التي بينت بأن تجريع الفئران والجرذان بالباراسيتامول [24][23]، والرصاص [25]، والمبيدات مثل الباراكوت ديكلوريد [26]، والجينتاميسين [27]، ومضادات الاكتئاب مثل دولوكستين و ترازودون [28][29]، والمعادن الثقيلة كالكادميوم، تحث جميعها على الإجهاد التأكسدي لخلايا الكبد مسببة ارتفاع كل من ALT و AST [30] يعود سبب ذلك إلى تضرر خلايا الكبد وأكسدة الجزيئات الضخمة في الانسجة [31] وتشكل جذور حرة مؤكسدة (ROS) تهاجم لبيدات الغشاء الخلوي مؤدية إلى تخربها وتحرر الأنزيمات في الدوران الدموي مما أدى لارتفاع في تراكيزها في مصل الدم [32] .

تُظهر نتائج الدراسة الحالية حدوث انخفاض معنوي $P<0.05$ في متوسطات قيم AST و ALT في مصل دم حيوانات المجموعتين الثالثة والرابعة، بالمقارنة مع فئران المجموعة الثانية المستحدث فيها التشحم وهذا يثبت التأثير العلاجي لكل من المستخلص الكحولي لأوراق السلبين والأتورفاستاتين في حماية خلايا الكبد، وقد يعود سبب ذلك إلى إمكانية تأثير بعض المواد الفعّالة، الموجودة في أوراق السلبين مثل (الفلافونوئيدات والفينولات) وعملها كمضادات أكسدة وربما تفاعلها بشكل مباشر مع الجذور الحرة وإنتاج مركبات مستقرة كيميائياً تُحارب الجذور الحرة وتُخفّض من معدلات الاجهاد التأكسدي [34][33]، كما يعود انخفاض تراكيز ALT و AST في المجموعة الرابعة أيضا إلى أهمية مكونات الأتورفاستاتين الدوائية في حماية خلايا الكبد وتخفيضه لمستويات الدهون والكوليسترول [18] ، وبمقارنة تأثير كل من المستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين في المجموعة الثالثة والاتورفاستاتين في المجموعة الرابعة على تراكيز ALT, AST, TG ، فقد ظهر التشابه إلى حد كبير، إذ بيّنت النتائج انخفاضا معنويا $P<0.05$ في متوسطات قيم المعايير السابقة في المجموعتين، ممّا يُشير إلى الأهمية الطبية لمكونات كل منهما الفعالة في حماية خلايا الكبد من التضرر .

أظهرت نتائج الدراسة عند مقارنة تغيّر معدلات سكر الدم في مجموعات العمل، أنه لاوجود لفروق معنوية $P>0.05$ بين المجموعات الثلاث الأولى (الشاهدة، المستحدث فيها التشحم، السلبين)، بينما كان الفرق معنويا $P<0.05$ وذو دلالة إحصائية بين فئران المجموعة الرابعة المعالجة بالأتورفاستاتين وباقي مجموعات العمل، ممّا يُظهر دور الأتورفاستاتين في رفع معدّل سكر الدم وقد يعود سبب ذلك إلى أن الأتورفاستاتين يقلل من حساسية الأنسولين ويزيد نسبة السكر في الدم المحيط [35] .

لقد أظهرت نتائج الدراسة النسيجية في أكباد فئران المجموعة الثانية حدوث تشحم واضح وصل في بعض المقاطع لدرجة التنخر والتضرر الخلوي، حيث لوحظ تشكّل استحالات في الخلايا الكبدية مع تغيّر تموضع النواة في الخلايا المتشحمة الشكل(10) من المركز باتجاه المحيط، كما لوحظ تحسّناً واضحاً في أكباد فئران المجموعة الثالثة، وهذا مايُؤكّد احتواء المستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين على مضادات أكسدة تُقلّل من الإجهاد التأكسدي وتحمي

الخلايا من الضرر المحدث برابع كلوريد الكربون، وقد كان التحسن واضحاً أيضاً في أكباد فئران المجموعة الرابعة، حيث ظهر تأثير محتواه الكيميائي مماثلاً تقريباً كما ظهر في أكباد فئران المجموعة الثالثة .

تتوافق نتائج الدراسة النسيجية الحالية مع نتائج الدراسات والأبحاث العلمية التي أظهرت الدور المهم لبذور الكتان.Linum usitatissium L من الفصيلة الكتانية Linaceae [36] وزيت بذور الكتان في منع الإجهاد التأكسدي، ومنع الانتباج الخلوي لأنسجة الكبد المحدث بعديد السكاريد الشحمي [37]، وتقليل الإفراط في تراكم الدهون في الأنسجة الكبدية والإستحالة البالونية [39][38] .

الاستنتاجات والتوصيات

1-يؤدي الحقن برابع كلوريد الكربون في إحداث التشحم الكبدي .

2-تظهر الدراسة الحالية الدور العلاجي للمستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين(العكوب الجبلي) في خفض شحوم الدم .

3-تشير الدراسة الحالية إلى الدور المهم للأتورفاستاتين .

4-لا يؤثر المستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين(العكوب الجبلي) في تغيَر معدل سكر الدم، في حين لوحظ تأثيراً إيجابياً للأتورفاستاتين .

Reference

1- Azwanida N. *A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation*,2015.

2- Juma KK, Maina SG, Muriithi JN, Mwangi BM, Mworia KJ, Mwonjoria MJ, Ngeranwa JN, Mburu ND. *Protective Effects of Urtica dioica and Cimetidine® on Liver Function Following Acetaminophen Induced Hepatotoxicity in Mice*, 2015.

3- Jamshidzadeh A, Fereidooni F, Salehi Z, Niknahad H. *Hepatoprotective activity of Gundelia tourenfortii*.pp 233-237, 2005.

4- Ertug F, *An ethnobotanical study in Central Anatolia*. pp 155–182, 2000.

5- Al-Younis NK, Argushy ZM. *Antibacterial evaluation of some medicinal plants from kurdistan region*. pp256-261, 2009.

6- Hildebert W, Hubertus N, Aynehchi Y. *Molluscicidal saponins from Gundelia tournefortii*. Pp 2505-2508,1984.

7- Azeez O H, Kheder A E, *Effect of Gundelia tournefortii on some biochemical parameters in dexamethasone-induced hyperglycemic and hyperlipidemic mice*. Pp 73–79, 2012.

8 - Samani M A, Rafieian M K, Azimi N, *Gundelia: a systematic review of medicinal and molecular perspective*. pp 1238–1247, 2013.

9- Darwish R M, Aburjai T A, *Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on Escherichia coli*. pp 10, 2010.

10- Cohen J C, Horton J D, Hobbs H H. *Human fatty liver disease: old questions and new insights*. Pp 1519-1523, 2011.

11- Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL Am, *Physiol Endocrinol Metab*.pp 462-468, 2005.

12- Argo CK, Caldwell SH, *Clin. Liver Dis.* 2009.
13- Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA, *Hepatology*.pp 32- 1820,2010.
14- Moore JB, *the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome.*pp 211-220 , 2010.
15- Sanna C, Rosso C, Marietti M, Bugianesi E. *Non-alcoholic fatty liver disease and extra-hepatic cancers*. Pp 717, 2016.
16- Fan JG. *Epidemiological studies of nonalcoholic fatty liver disease in China*. Pp 4-6, 2010.
17- Farzaei MH, Rahimi R, Farzaei F, Abdollahi M. *Traditional medicinal herbs for the management of diabetes and its complications.pp* 874-887, 2015.
18- Gomez Dominguez E, Gisbert J P, Moreno Monteagudo J A, Garcia Buey L, Moreno Otero R, *A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipemid non-alcoholic fatty liver patients*, pp 1643–1647, 2006.
19- Alviano SW, Antoniolli RA, Farias ML, Luiz WG. .*In vitroantioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteriabased on Brazilian folk medicine*. pp545 – 552, 2008.
20- Sook Song IM, *Multiple alterations of canalicular membrane transport activities in rats with CCl4 -induced hepatic injury*, Pp 482- 489(2003).
21- Maity T, Ahmad A, Pahari N, Ganguli, S*), Hepatoprotective activity of mikania scandens (L.) willd. against diclofenac sodium induced liver toxicity in rats.*pp 185-189,2012.
22- Meinrad B , Lutz WD. Weber, *Eberhard Becker and Andreas Stampfl, Mechanism of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. Hepatocellular Damage by Reactive Carbon Tetrachloride Metabolites*, pp 649-659 ,2001.
23- Fadel H, Darious M, shhada K, *Effect of aqueous extract of rosemary leaves on some liver function in rabbits after acetaminophen treatment,*2015.
24- Tung B, Hai N, Son P, *Hepatoprotective effect of Phytosome Curcumin against paracetamol-induced liver toxicity in mice.*
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences Vietnam, 2017.
25- Wang J, Yang Z, Lin L, Zhao Z, Liu Z, Liu X, *Protective Effect of Naringenin Against Lead-Induced Oxidative Stress in Rats.*
Pp 354-359,2012.
26- Ujowundu C, Nwaogu L, Ujowundu F, Oparaeche N, Oyarebu A. *Hepatotoxicity of Paraquat Dichloride and Ameliorative Effect of Nutritional Supplements*,2018.
27- Galaly S, Ahmed O, Mahmoud A, *thymoquinone and curcumin prevent gentamicin-induced liver injury by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis.* pp823-832, 2014.
28- Abdel Salam O, Youssef Morsy S, Sleem A. *the effect of different antidepressant drugs on oxidative stress afte lipopolysaccharide administration in mice.* Pp203-290, 2011.
29- Voican C, Corruble E, Naveau S, Perlemuter G. *Antidepressant- Induced Liver Injury: A Review for Clinicians.* Pp 404-415, 2014.
30- Rehman H, Aziz A, Saggu S, VanWert A, Zidan N, *Additive toxic effect of deltamethrin and cadmium on hepatic, hematological, and immunological parameters in mice,*pp 495-502, 2017.
31- Sivakumar V, Sadiq A, Rajan M, Jayanthi M, Paari E. *Hepatoprotective Effect of Solanum xanthocarpum in Paracetamol Induced Hepatic Damage in Experimental Animals*, pp 125- 130,2014.

32- Bogen K, Benson J, Yost G, Morris J, Dahl A, Clewell H, Krishnan K, Omiecinski K. *Naphthalene metabolism in relation to target tissue anatomy, physiology, cytotoxicity and tumorigenic mechanism of action*, 2018.
33- AL Jumail F, AL Azawi A. *hepatoprotective activity of lignan compound from flaxseed (linumusitatissimum l.) agains acetaminopheninduced hepatotoxicity in rabbits,*pp 56-72,2013.
34- Zamzami M, Baothman O, Samy F, Abo-Golayel M**,** *Amelioration of CCl4-Induced Hepatotoxicity in Rabbits by Lepidium sativum Seed*,2019.
35- Kwang K K, Michael J. Quon, Seung H H, Yonghee L, Soo J, Kim R, Eak K S, *Atorvastatin Causes Insulin Resistance and Increases Ambient Glycemia in Hypercholesterolemic ,pp*1209– 1216, 2009.
36- Darious M, Daoud A, Dawarw A, Effect of flaxseed alcoholic *extract on naphthalene-induced liver damage in Syrian hamsters* , 2020.
37- Abdel Salam O, Youssef Morsy S, Sleem A, *the effect of different antidepressant drugs on oxidative stress afte lipopolysaccharide administration in mice.*pp 290-203,2011.
38- Xu J, Gao H, Song L, Yang W, Chen C, Deng Q, Huang Q, *Flaxseed oil and alphalipoic acid combination ameliorates hepatic oxidative stress and lipid accumulation in comparison to lard*,2013.
39- Xu J, Rong S, Gao H, Chen C, Yang W, Deng Q, Huang Q, Xiao L, Huang F. *A, Combination of Flaxseed Oil and Astaxanthin Improves Hepatic Lipid Accumulation and Reduces Oxidative Stress in High Fat-Diet Fed Rats,* 2017.